

36 F 0  
(16 B 67)

特 許 庁  
特 許 公 報

特 許 出 願 公 告  
昭 41-5907  
公 告 昭 41. 3. 30  
(全 4 頁)

2-ケートーL-グロン酸の製造法

特 願 昭 37-43886  
出 願 日 昭 37.10.2  
発 明 者 望月一男  
宝塚市伊予志字円国寺 159 の 5  
同 神崎俊彦  
宝塚市鹿塩字高丸 1 の 3 5  
同 岡崎尚良  
吹田市山田下 520  
同 土居宗晴  
同 所 磯野正雄  
西宮市菊谷町 4 3  
同 中西造  
大阪市東住吉区田辺東之町 5 の 3 4  
同 笹島賢一  
西宮市神垣町 2 7  
出 願 人 武田薬品工業株式会社  
大阪市東区道修町 2 の 2 7  
代 表 者 三木孝造  
代 理 人 弁理士 松居祥二

発明の詳細な説明

本発明は2-ケートーL-グロン酸の製造法に関する。

2-ケートーL-グロン酸はビタミンCの合成中間体として有用なものであり、従来はたとえば、L-ソルボースを硫酸の存在下アセトンで処理してジアセトン・ソルボースにし、これを酸化してジアセトン-2-ケートーL-グロン酸にする方法、5-ケートーグルコン酸を還元してイドン酸にしこれを微生物で酸化して2-ケートーL-グロン酸にする方法等が知られているが、これらはいずれも数工程を要し、操作が複雑となり、また収率の低下も免れず、工業的にはかならずしも有利な方法であるとはいえなかつた。

本発明者らはこのような事情に鑑み種々研究を行つた結果、ソルボースより1工程で2-ケートーL-グロン酸を生成する方法を見出し本発明を完成した。

すなわち本発明はアセトバクター属に属する菌株をソルボースを含有する培地に培養するか、この菌株の菌体処理物とソルボースを接触させることを特徴とする2-ケートーL-グロン酸の製造法である。

本発明方法における菌株は、アセトバクター属のう

ちでソルボースより2-ケートーL-グロン酸を生成するものであればいかなるものでもよく、これらの具体例としてはたとえばアセトバクター・サブオキシダンス、アセトバクター・キシリナム、アセトバクター・グルコニカム、アセトバクター・ルビギノース、アセトバクター・オオランチウム、アセトバクター・アルビダス、アセトバクター・セリナス、バクテリウム・オルレアネンス、アセトバクター・ジオキシアセトニカス、アセトバクター・カプスラトス、アセトバクター・ノンオキシグルコニカス、アセトバクター・メラノゲナム、アセトバクター・インダストリウム等が挙げられる。なおこれらの菌株をたとえば紫外線、X-線、ナイトロジェンマスタードなどの変異剤によつて人工的に変異させた変異株も同様に用いる。

これらの微生物は米国イリノイ州ベオリアの米国農務省北部利用研究所、ワシントン市の米国模範培養蒐集所、オランダ国バーンの微菌培養中央局、英国デイントンの国立産業細菌蒐集所、また我国においては東大応用微生物研究所、財団法人発酵研究所のような公共の菌種保存機関から常時入手することもできるし、また微生物学上現在用いられている手段で天然に存在するこれらの菌を単離することもできる。

なお本発明に使用する2-ケートーL-グロン酸生産菌の選択はたとえば下記の方法によつて行うことができる。すなわち斜面培養により菌体を作り、以下のごとく培地に接種する。

培地例 1

ソルボース 2%、グリセリン 0.01%、ポリペプトン 0.05%、コーンステープリカー 1%、第一リン酸カリウム 0.003%、第二リン酸カリウム 0.007%、硫酸マグネシウム(7水和物) 0.001%、硫酸第一鉄(7水和物) 0.001%、塩化ナトリウム 0.005%

培地例 2

ソルボース 2%、酵母エキス 0.5%

菌を接種した培地を 200 rpm ロータリーシェーカーで 28℃ において培養し、適当時間毎に培養液を採取し、アンバーライト IR-120 (H型) で処理後水飽和フエノールを使用してペーパークロマトグラフィーを行つた。

2-ケートーL-グロン酸は R<sub>f</sub> 約 0.2 にスポットが認められる。

また定量はペーパークロマトグラム上の2-ケートーL-グロン酸を抽出し、ソモジー・ネルソン法を適用して行つた。

BEST AVAILABLE COPY

本発明方法においては、前記のごとき菌株をソルボーズを含有する培地に培養してもよく、またはその菌株の菌体処理物とソルボーズとを接触させてもよい。

前者の方法において細菌の培養は一般に酸化発酵の様式に従って行われる。培養の手段としては静置培養でもよくまた通気攪拌培養でもよい。培地は通常液体培地が好ましいが、もちろん固型培地でもよい。

2-ケイ-L-グロン酸の生成に適当な栄養培地としては、目的を達しうるかぎり何ら特別の制限はなく、たとえば菌が同化しうる炭素源、窒素源、その他無機塩類、さらに微量の栄養素等を適当に含有しているのが好ましい。すなわち窒素源としてはたとえばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンステープリカー、ペプトン、肉エキス、大豆粉、小麦粉、酵母エキス、酵母、尿素等の無機または有機の窒素含有物が、炭素源としては原料であるソルボーズの他に補助炭素源としてたとえばグリセリン、蔗糖乳糖、麦芽糖、デキストリン、糖蜜等が、無機塩類としてはたとえばカルシウム塩類、マグネシウム塩類、カリウム塩類、亜鉛塩類、銅塩類、その他の金属塩類等が、さらにまた必要に応じて目的物質生成促進因子等がそれぞれ用いられ、目的に応じてこれらの中から適宜に選択される。

これらの各栄養物質の配合割合、量等はたとえば使用する菌種、原料の使用量等によっても異なり、各場合に依りて最も適当な量を選択決定すればよい。

培地中のソルボーズの濃度はたとえば菌株の種類等によっても異なり一律にはいえないが通常約1~200 g/l、特に約10~50 g/l程度が好ましい。

培養条件はもちろん菌の種類、培地の組成等によっても異なるが通常約20~35℃付近の温度で培地のpHを約3~9に保持して培養を行うのが好ましい。培養時間は通常約10~200時間程度でよく、このあたりで2-ケイ-L-グロン酸の生成量が最大となる。

原料ソルボーズは培養開始時に培地に添加していてもよく、また培養途上の適宜の時期に培地に添加してもよい。

なお培養中培地のpH値を常に酵素活性に適した値に保持するため、場合によつては培養の進行にともなつて培地中に適宜の塩基性物質あるいは酸性物質を適量添加混合してもよく、また培地中に予め適宜の緩衝剤を適量添加混合しておいてもよい。

本発明の方法においては、また前記のごとき菌体の菌体処理物とソルボーズとを接触させてもよい。菌体処理物としてはたとえば菌体または菌体摩砕物にアセトンを添加して生成する沈殿を採取乾燥したいわゆるアセトンパウダー等の形態のものが好んで用いられるが、その他生菌の細胞体、凍結乾燥処理した菌の細胞体、それらの摩砕物等も同様に用いられる。なおこの

場合の操作条件は前記の培養における条件に準じて適宜に選択決定すればよい。

また本発明者らの研究によると、菌体処理物を用いる場合、その菌体の生産する酵素がソルボーズに接触して2-ケイ-L-グロン酸が生成されると考えられる。

かくして生成した2-ケイ-L-グロン酸はその性状を利用した適宜の手段で分離精製する。なお2-ケイ-L-グロン酸は遊離の酸として分離してもよく、たとえばナトリウム、カリウム、カルシウム、アンモニウム等の塩として分離してもよい。

分離の方法としては目的を阻害しないかぎりいかなるものでもよいが、たとえば必要に応じて反応生成物から濾過、遠心分離あるいは活性炭処理等を行つて菌体を除去した後、この発酵生成物溶液をそのまま濃縮、再結晶等により目的物をとり出す方法、溶媒で抽出する方法、たとえば活性炭、酸性白土、モレキュラーシーブ、イオン交換樹脂等の適宜の吸着剤と溶液とを接触させ目的物を吸着剤に吸着させついで適宜の溶媒で脱着して精製する方法等を単独で、適宜に組み合わせ、あるいは、反復適用することによつて行うこともできる。

なお2-ケイ-L-グロン酸が遊離型で得られる場合はこれを適宜の方法によつてたとえばナトリウム、カリウム、カルシウム、アンモニウム等の塩にしてもよく、また塩として得られた場合はこれを適宜の方法によつて遊離型あるいは他の塩に変えてもよい。

本発明における2-ケイ-L-グロン酸の同定はたとえば元素分析、融点、赤外部吸収スペクトル、旋光度などの物理的性状によつても行いうる。

以上のごとき本発明の方法によれば、ソルボーズより工程で2-ケイ-L-グロン酸を得ることができ、操作も簡単であり、収率も良好で工業的にきわめて有意義である。

#### 実施例 1

ソルボーズ2%、酵母エキス0.5%、炭酸カルシウム1%からなる培地150 mlを内容1 lの振盪びんに調整し、10 lb/in<sup>2</sup>の蒸気圧で10分間滅菌する。この培地を含む振盪びん10本に、斜面培地上に2日間、28℃で培養したアセトバクター・サブオキシダンス・ATCC 621のr線照射変異株の殺菌水懸濁液10 mlを接種し、28℃下5日間振盪培養した。

この培養液1 lを炭末50 gをしいた濾過器で吸引濾過する。ついで濾液をアンバーライトIR-120を充填した塔に通し、通過液を減圧下で濃縮すると2-ケイ-L-グロン酸の結晶が析出する。本品は融点160℃を示したが、これを少量の水から再結晶したものと、そのメチル誘導体の融点・赤外部吸収スペクトルなど

の物理的性状はソルボーズから合成法により得られた標準2-ケート-L-グルン酸およびそのメチル誘導体のそれと全く一致した。

#### 遊 離 酸

融 点: 165 ~ 166 °C

元素分析:  $C_6H_{10}O_7 \cdot H_2O$  として

計算値 C: 34.01 %, H: 5.7 %

実験値 C: 34.5 %, H: 5.8 %

#### メチル誘導体

融 点: 154 ~ 155 °C

元素分析:  $C_7H_{12}O_7$  として

計算値 C: 40.28 %, H: 5.62 %

実験値 C: 40.3 %, H: 5.9 %

#### 実施例 2

アセトバクター・サブオキシダンス ATCC 621 の r 線照射変異株をソルボーズ 2 %、グルコース 0.5 %、酵母エキス 0.5 % からなる培地 500 ml に 18 時間、30 °C で振盪培養を行いこれを種培養とした。

ソルボーズ 5 %、グルコース 0.5 %、酵母エキス 0.5 %、炭酸カルシウム 2 % からなる培地 30 ℓ を 50 ℓ のステンレス製培養タンクに仕込み、加圧滅菌後、上記の種培養 500 ml を移植し、培養温度 28 ~ 29 °C、通気量 15 ~ 24 ℓ/min、攪拌回転数 280 rpm、内圧 15 ~ 20 lb/in<sup>2</sup> で 120 時間培養した。

ここで得られた培養液中にはもはや原料基質のソルボーズは全く残存せず、2-ケート-L-グルン酸の生成量は約 550 ㍉/100 ml であった。

培養液をシャープレス型遠心分離器にかけて菌体を除去し、透明な濾液約 25 ℓ が得られた。この濾液 1 ℓ に炭末 50 g を加えてから再び濾過しついでアンバーライト IR-120 (H 型) を充填した塔を通過させて陽イオンを除去、ついでこれを減圧下に濃縮して 2-ケート-L-グルン酸の結晶を析出せしめた。収量は濾液 1 ℓ あたり 4.5 g であった。

#### 実施例 3

ソルボーズ 5 %、酵母エキス 0.5 %、炭酸カルシウム 2 % からなる培地 150 ml を内容 1 ℓ の振盪びんに調製し 10 lb/in<sup>2</sup> の蒸気圧で 10 分間滅菌する。この培地を含む振盪びん 10 本に、斜面培地に 28 °C で 2 日間培養したアセトバクター・キシリナム IF 03144 の柴外線変異株に殺菌水 10 ml を加えて懸濁液をつくり、その 5 ml 宛を接種し、28 °C 毎分 225 回転の回転式振盪機で振盪培養する。7 日に培養を停止し、培養物を濾過し、菌体を除く。濾液をアンバーライト IR-120 のカラムに通して脱塩し、次にアンバーライト IR-45 に通して生成した 2-ケート-L-グルン酸を吸着させ、水洗後 IN カセイカリで溶出する。

溶出液を活性炭で処理して脱色し、再びアンバーラ

イト IR-120 のカラムに通して遊離の 2-ケート-L-グルン酸溶液を得る。これをフラッシュエバポレーターで濃縮し、2-ケート-L-グルン酸の粗結晶 5.4 g を得た。

#### 実施例 4

下記の組成を有する培地 15 ml を 200 ml 振盪びんに分注滅菌し、アセトバクター・セリナス (IF 03266) およびアセトバクター・サブオキシダンスの斜面培養からそれぞれ直接 1 白金耳接種し、28 °C、200 rpm のロータリー・シェーカーで 7 日間培養した。

##### 培地 1

ソルボーズ 2 %、酵母エキス 0.5 %

##### 培地 2

ソルボーズ 2 %、グリセリン 0.01 %、ポリペプトン 0.05 %、コーンスチープリカー 1.0 %、第一リン酸カリウム 0.003 %、第二リン酸カリウム 0.007 %、硫酸マグネシウム (7 水和物) 0.001 %、硫酸第一鉄 (7 水和物) 0.001 % 塩化ナトリウム 0.005 %

各培養時間にサンプルを採取し水飽和フェノールを使用してペーパークロマトグラフィーを行い、2-ケート-L-グルン酸相当部分より該物質を抽出し、ソモジーネルソン法により定量を行った。結果は次の通りである。

表 1

	菌 株	培 養 日 数		
		3 日	5 日	7 日
2 酸 1 含 ケ 量 ト 1 r L / 1 ml グ ロ ン	アセトバクター・セリナス			
	培地 1	105	190	185
	培地 2	65	110	120
	アセトバクター・サブオキシダンス			
	培地 1	80	126	145
	培地 2	45	97	138

また同じ条件で、花から分離された未同定のアセトバクターに属する 2 菌株につき培養を行った結果次のような数値が得られた。

表 2

	菌 株	培 養 日 数		
		3 日	5 日	7 日
2 酸 1 含 ケ 量 ト 1 r L / 1 ml グ ロ ン	アセトバクター・619			
	培地 1	80	110	135
	培地 2	80	95	125
	アセトバクター・618			
	培地 1	460	890	1010
	培地 2	290	580	880

#### 実施例 5

実施例 4 に示したアセトバクター・セリナスにつき

タンク培養を行い生成物の同定を行つた。

前述の培地 / 500 ml を分注、滅菌した 2 ℓ の振盪びんにアセトバクター・セリナスの斜面培養 1 本を接種 28℃ で 48 時間振盪培養を行う。別に培地 / 30 ℓ を 50 ℓ タンクに仕込み滅菌しておき上記種培養 500 ml を接種、28℃ 260 rpm. 30 ℓ / min の通気量で培養を行つた。

各培養時間の培養液を採取し実施例 1 と同じ方法により 2-ケートーL-グロン酸を定量した結果は次の通りであつた。

培養日数	3 日	5 日	7 日
2-ケートーL-グロン酸 $\gamma$ / ml	95	186	231

かくして得られた培養液 26 ℓ をハイフロスーパーセルを通して濾過し、濾液をアンバーライト I R - 200 (H 型) に通し、通過液をダウエツキス X E - 168 に通して 2-ケートーL-グロン酸を吸着させる。つぎに I N-アンモニア水を用いて溶出し、溶出液を濃縮し、活性炭を加えて脱色処理後この処理液をアンバーライト I R - 200 の樹脂で処理し、pH 約 1.5 にして 2-ケートーL-グロン酸をダウエツキス X E - 168 に吸着せしめた後 0.1 N アンモニア水で溶出し、溶出液を減圧濃縮して 2-ケートーL-グロン酸の結晶 4.5 g を得た。本品は標準 2-ケートーL-グロン酸と同一の性状を示した。

#### 実施例 6

実施例 4 の方法に従つて、下記の各菌株を培養し培養液のペーパークロマトグラフィー (展開溶媒として水飽和フェノールを使用) によつて、2-ケートーL-グロン酸の生成を認めた。

アセトバクター・サブオキシダンス	ATCC	621
"	"	NRRL B-72
"	"	IFO 3256

アセトバクター・サブオキシダンス	IFO	3254
"	グルコニカム	ATCC 9324
"	"	IFO 3285
"	キシリナム	ATCC 10245
"	ルビギノース	IFO 3243
"	"	IFO 3244
"	オーランチウム	IFO 3245
"	"	IFO 3248
"	"	IFO 3249
"	アルビダンス	IFO 3250
"	"	IFO 3251
"	"	IFO 3253
"	セリナス	IFO 3263
"	"	IFO 3264
"	"	IFO 3265
"	"	IFO 3266
"	"	IFO 3268
"	"	IFO 3269
"	"	IFO 3270
"	デオキシアセトニカス	IFO 3271
"	メラノゲナム	IFO 3292
"	"	IFO 3293
アセトバクター・メラノゲナム	IFO	3294
"	ノンオキシグルコニカス	IFO 3275
"	インダストリウム	IFO 3260
"	カブスラドス	NRRL B-1225

#### 特許請求の範囲

1 アセトバクター属に属する菌株をソルボースを含む培地に培養するか、この菌株の菌体処理物とソルボースを接触させることを特徴とする 2-ケートーL-グロン酸の製造法。